

Copyright 2016, ABRACO

Trabalho apresentado durante o INTERCORR 2016, em Búzios/RJ no mês de maio de 2016.

As informações e opiniões contidas neste trabalho são de exclusiva responsabilidade do(s) autor(es).

LEGENDA:

Avaliação da formação de biofilmes em aço duplex e super-duplex

Walter B. Cravo Júnior^a, Diogo A. Coutinho^b, Ana C.C. de Albuquerque^c, Cynthia de A. Andrade^d, Maíra P. de Sousa^e, Claudia Groposo^f

Abstract

Microorganisms tend to adhere to surfaces forming biofilms that may cause degradation of metallic and non-metallic materials, reducing equipment life. The present study evaluated the biofilm formation in duplex and super duplex stainless steel through monitoring planktonic, sessile microbial community and open circuit potential evolution. Coupons were installed in a recipient with constant seawater pumping in order to renew essential nutrients for the microbial metabolism. To understand OCP behavior in some tests, coupons and water were sampled and analyzed (MPN) in order to quantify the microbial groups present (aerobic and anaerobic bacteria, Iron Bacteria and SRB). Additionally, molecular biology techniques have been used to detect the presence of total bacteria and SRB. Comparison between duplex and super duplex finds greater adherence of microorganisms to duplex steel. Molecular biology techniques confirmed the presence of total bacteria and absence of SRB in water samples.

Keywords: biofilm, duplex, super duplex

Resumo

Microrganismos tendem a aderir às superfícies formando biofilmes que podem degradar materiais metálicos e não metálicos, reduzindo a vida útil de equipamentos. O presente estudo avaliou a formação de biofilmes em aços inoxidáveis duplex e superduplex através do monitoramento da comunidade microbiana planctônica e sésil e do acompanhamento da evolução do potencial a circuito aberto (OCP) com o tempo. Os cupons metálicos foram instalados em um recipiente com bombeamento contínuo de água do mar para renovar os nutrientes essenciais ao metabolismo microbiano. Para entender o comportamento do potencial ao longo do tempo em alguns testes, os cupons e a água foram analisados (NMP) para quantificar os grupos de interesse (bactérias aeróbias e anaeróbias, ferrobactérias e BRS). Técnicas de biologia molecular foram usadas para detectar a presença de bactérias totais e BRS. A comparação entre os materiais mostrou uma maior aderência microbiana ao aço duplex, quando comparada ao aço superduplex. As técnicas de biologia molecular confirmaram a presença de bactérias totais e a ausência de BRS nas amostras de água.

^a Mestre, Engenheiro de Petróleo – Instituto Nacional de Tecnologia – INT

^b Engenheiro Civil - Instituto Nacional de Tecnologia – INT

^c PHD, Engenheira Civil – Petrobras – E&P Sul/Sudeste

^d Mestre, Química de Petróleo – Petrobras – CENPES

^e Mestre, Bióloga – Petrobras – CENPES

^f PHD, Bióloga – Petrobras – CENPES

Palavras-chave: biofilme, duplex, superduplex.

Introdução

O desempenho dos aços inoxidáveis duplex (UNS 32205) e superduplex (UNS 32750) para serviços de água do mar é controverso, principalmente, nos cenários de águas tropicais onde a temperatura média do local de captação é relativamente alta (cerca de 27°C). Para avaliar os limites de aplicação destes materiais em condições similares às das plantas de injeção e resfriamento de água do mar da Petrobras, realizaram-se ensaios de laboratório variando-se parâmetros como: temperatura, vazão, frequência de renovação da água do mar e acabamento superficial dos espécimes que são fundamentais para a geração de biofilme microbiano em superfícies metálicas. Nestes ensaios, o potencial livre de corrosão foi acompanhado continuamente, visto que o enobrecimento do potencial é indicativo da formação de biofilme microbiano em corpos de prova, além de ser essencial para a ocorrência de corrosão localizada em materiais nobres. Não foi possível obter a elevação do potencial (formação de biofilme marinho) em todos os experimentos, o que foi atribuído à vazão insuficiente da água do mar e à baixa frequência de troca do inventário de alguns testes, o que impediu a renovação dos nutrientes essenciais ao metabolismo microbiano. Na tentativa de entender os diferentes comportamentos eletroquímicos dos materiais relacionados à presença/ausência de biofilme, foram efetuadas análises microbiológicas na água do mar e nos cupons ensaiados. Foram quantificados os grupos de bactérias aeróbicas, anaeróbicas, ferrobactérias e bactérias redutoras de sulfato (BRS) utilizando a técnica do Número Mais Provável (NMP). Realizaram-se, ainda, análise de biologia molecular (qPCR), microscopia óptica e citometria em fluxo. Os resultados indicaram que não é simples estabelecer uma correlação direta entre a elevação do potencial (formação do biofilme) e a quantificação microbiológica de bactérias planctônicas e sésseis, no entanto, foi possível observar uma maior adesão bacteriana nos biofilmes formados sobre os cupons de aço duplex relativamente aos de superduplex. Essa maior concentração celular, no entanto, não foi suficiente para diferenciar o comportamento em relação à corrosão observado nos dois materiais, após os ensaios. Recomendou-se dar continuidade a este estudo com o objetivo de conhecer a taxonomia das amostras, que possibilitaria definir as espécies aeróbicas responsáveis pelo enobrecimento do potencial.

Metodologia

Para realizar os testes de imersão em diferentes condições de exposição, visando avaliar a influência de vários parâmetros na formação do biofilme e na ocorrência de corrosão localizada de aços duplex (22Cr e 25Cr), empregaram-se água do mar natural, coletada na praia da Barra da Tijuca, RJ (Tabela I), e foi monitorado o potencial livre de corrosão ao longo do tempo em relação ao eletrodo de calomelano saturado (ECS). Foram utilizados corpos de prova na forma de chapa, na presença e na ausência de dispositivos de frestas (figura 1). O material do dispositivo de frestas foi o PVDF (fluoreto de polivinilideno), sendo este recoberto com fita de Teflon®. Empregou-se um torque de 20 N.m e uma rugosidade superficial de 2µm.

Tabela I - Análise química da água do mar coletada na Praia da Barra da Tijuca, RJ dezembro/2014.

| Analito | Resultado |
|------------|-----------|
| pH | 8,0 |
| Cloreto | 19500mg/l |
| Nitrato | <2mg/l |
| Fosfato | <2 |
| Brometo | 70mg/l |
| Fluoreto | <2 |
| Sulfato | 2615mg/l |
| Acetato | <5 |
| Formiato | N.D |
| Lactato | N.D |
| Propionato | N.D |
| Butirato | N.D |
| Sódio | 10690mg/l |
| Potássio | 377mg/l |
| Magnésio | 1270mg/l |
| Cálcio | 401mg/l |
| Estrôncio | 7,2mg/l |
| Bário | <0,1mg/l |
| Ferro | <0,1mg/l |
| Lítio | 0,14mg/l |
| Zinco | <0,1mg/l |

Empregaram-se corpos de prova de duplex (22Cr) e superduplex (25Cr), com dimensão aproximada de 25mm x 50 mm e composição química conforme Tabela II

Tabela II - Composição química dos materiais empregados na confecção dos corpos de prova, empregando espectrômetro de Emissão Óptica da Marca Belec.

| Elemento (%) | 22%Cr metal base | 25%Cr metal base |
|--------------|------------------|------------------|
| Cr | 22,08 | 25,26 |
| Mo | 3,04 | 3,62 |
| Ni | 5,04 | 6,13 |
| C | 0,065 | 0,072 |
| Fe | 66,82 | 62,81 |
| Mn | 1,16 | 0,78 |
| P | 0,01 | 0,007 |
| V | 0,087 | 0,072 |
| Ti | 0,011 | 0,014 |
| W | 0,50 | 0,401 |

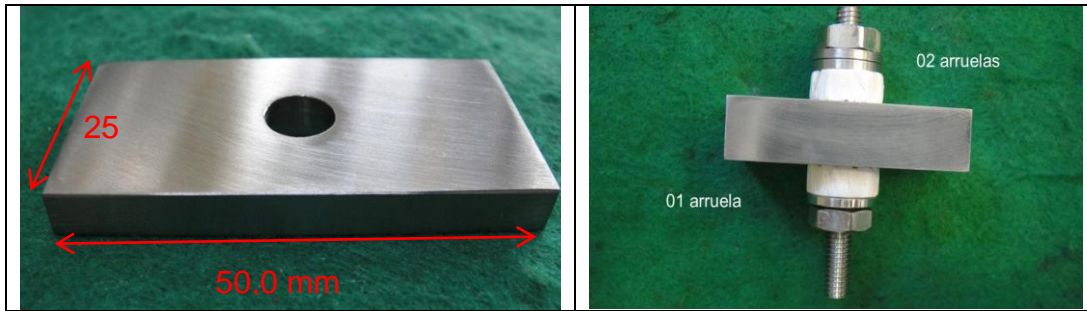


Figura 1 - Dimensões aproximadas dos corpos de prova e tipo de dispositivo de fresta empregado nos ensaios de imersão.

Utilizou-se uma célula de vidro, com capacidade de 4 litros, onde a amostra a ser testada e o eletrodo de referência (calomelano) foram fixados a uma tampa de teflon, através de uma haste de inox recoberta com Peek® (amostra) e uma ponte salina (eletrodo de referência). Empregou-se vazão de 16 mL/min e uma periodicidade de troca de inventário de água do mar de 3 dias. Para tal, utilizaram-se dois reservatórios de plástico com capacidade de 50 litros cada conectados a uma bomba peristáltica que fazia a transferência da solução para a célula de teste (Figura 2).



Figura 2 - Esquema do ensaio montado para os testes de potencial x tempo em água do mar natural realizados, com vazão de 16mL/min (22,8 L/dia).

O potencial a circuito aberto (OCP) das amostras expostas foi medido continuamente por meio de um potenciostato de alta impedância ($> 1011\Omega$) e no final dos testes as amostras foram fotografadas e analisadas em microscópio estereoscópico, com aumento de 20 vezes, para o registro de pites e frestas. Sempre que se detectava corrosão localizada nos corpos de prova, estes eram também analisados em microscópio ótico confocal (Alicona™), com aumento de 100 vezes, para medição de profundidade da corrosão localizada.

Para a quantificação dos diferentes grupos de interesse foi utilizada a metodologia do Número Mais Provável (NMP), de acordo com APHA (1998). Os meios de cultura e condições de cultivo foram: (1) caldo nutriente à temperatura de $40 \pm 1^\circ\text{C}$, por 48 horas, para bactérias aeróbias; (2) caldo fluido ao tioglicolato à temperatura de $40 \pm 1^\circ\text{C}$, por 28 dias, para bactérias

anaeróbias; (3) caldo citrato férrico amoniaco verde à temperatura de $40 \pm 1^\circ\text{C}$, por 14 dias, para ferrobactérias; e (4) Postgate E modificado à temperatura de $40 \pm 1^\circ\text{C}$, por 28 dias, para BRS.

Para extração do DNA foram utilizados os kits comerciais DNA IQ para Maxwell 16 e QIAamp® DNA Stool Mini Kit (Qiagen). Os métodos de extração foram selecionados de acordo com as especificidades e volumes de cada amostra. Após extração, o DNA foi submetido à PCR para identificação do gene codificador de RNA ribossômico (rRNA) 16S, comum a todos os gêneros de bactérias, e do gene *dsrAB*, exclusivo do grupo das BRS. Os produtos da reação de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% e corados com intercalante de DNA GelRed.

As análises microbiológicas foram realizadas em amostras coletadas em 25/09/2014 (após 30 dias de exposição) e compreenderam a água do reservatório (água do mar original), água da célula, biofilmes formados na mangueira de saída do reservatório e da célula, além dos biofilmes dos corpos de prova de aço duplex e superduplex.

Resultados e discussão

É reconhecido que o principal fator que influencia no desempenho dos aços inoxidáveis duplex em água do mar em temperaturas próximas a ambiente, é sua suscetibilidade à corrosão por pites e frestas decorrente da formação de um biofilme marinho sobre a superfície metálica. Quando isto ocorre, há um deslocamento do potencial de corrosão para direções mais nobres, podendo atingir valores da ordem de $+ 350 \text{ mV}$ (ECS), aumentando a probabilidade de ocorrência de corrosão localizada nestes materiais.

No entanto, nem sempre ocorre o enobrecimento do potencial e há duas razões para esta situação: [1] o biofilme está inativo, devido a fatores limitantes ao crescimento microbiano no ambiente (temperatura incompatível, falta de nutrientes, baixa concentração de bactérias, etc) ou; [2] o processo corrosivo teve início e se propagou imediatamente após a imersão do corpo de prova. Neste segundo caso, observa-se, ainda, uma instabilidade no potencial com oscilações significativas no seu valor.

Assim, após realizar várias tentativas para a formação de biofilme em corpos de prova em laboratório, determinou-se que as condições mais críticas para a ocorrência de corrosão dos aços inoxidáveis foram: dispositivo preso por 03 arruelas e rugosidade de $2,0 \mu\text{m}$, filtração da água do mar e um torque para 20 N.m. Este maior torque foi possibilitado pela substituição do material do dispositivo de frestas por PVDF que apresenta maior resistência mecânica do que a cerâmica.

A figura 3 que apresenta a curva potencial x tempo dos corpos de prova de 22Cr e 25Cr, levantada em temperatura ambiente e com vazão bem superior à empregada nos testes iniciais (não apresentados neste trabalho), revela que houve enobrecimento do potencial a circuito aberto para ambos os materiais (formação de biofilme) e que o aço 25Cr (superduplex) atingiu o patamar superior ao do aço duplex (22Cr), de ordem de $+ 315 \text{ mV/ECS}$ (curva azul da figura 3). Na Figura 3 verifica-se, ainda, que o enobrecimento só ocorreu após cerca de 30 dias e que o potencial do aço duplex 22Cr apresentou oscilações logo após atingir o patamar

máximo (curva vermelha). Este comportamento é indicativo da ruptura do filme passivo e da ocorrência de corrosão localizada deste material. Em contrapartida, o comportamento do potencial de circuito aberto versus tempo do aço 25Cr revela indícios de que o superduplex não foi suscetível à corrosão por frestas nestas condições de teste.

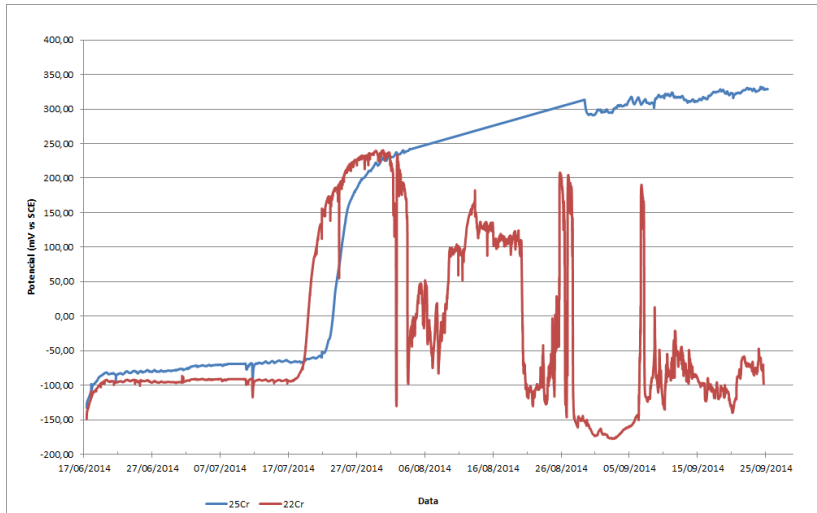


Figura 3 - Curva Potencial x Tempo dos aços duplex 22Cr e superduplex 25 Cr em água mar natural com vazão de 16 ml/minuto e com sistema fresta de PVDF recoberto com Teflon (três arruelas), rugosidade dos cps de $2\mu\text{m}$ e torque de 20Nm.

A análise dos cupons no microscópio Alicona™, após o ensaio, confirma o resultado do levantamento de potencial e revela corrosão por frestas apenas no aço 22Cr com profundidade de pite na faixa de $176\mu\text{m}$, conforme apresentado Figura 4.

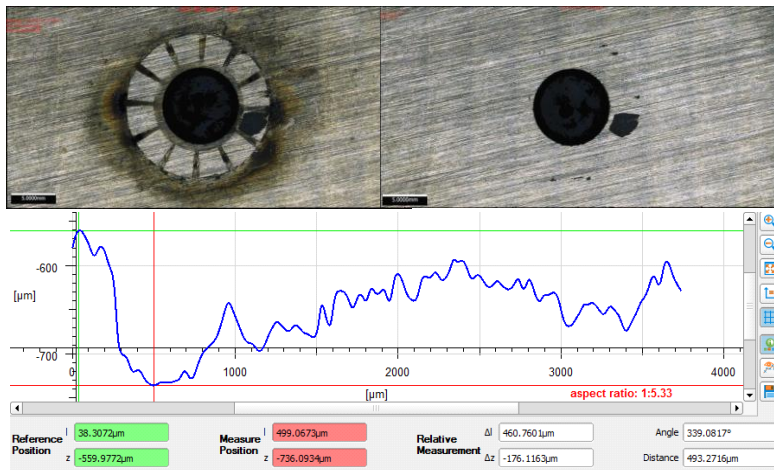


Figura 4 – Avaliação ao microscópio do corpo de prova de aço duplex 22Cr após ensaio em água do mar natural. Aumento de 50x.

Os resultados das análises microbiológicas de fluidos e cupons (biofilme), apresentados na Figura 5, revelaram uma alta concentração de bactérias aeróbias no fluido do reservatório, refletindo-se em uma alta concentração deste grupo bacteriano nas demais amostras coletadas.

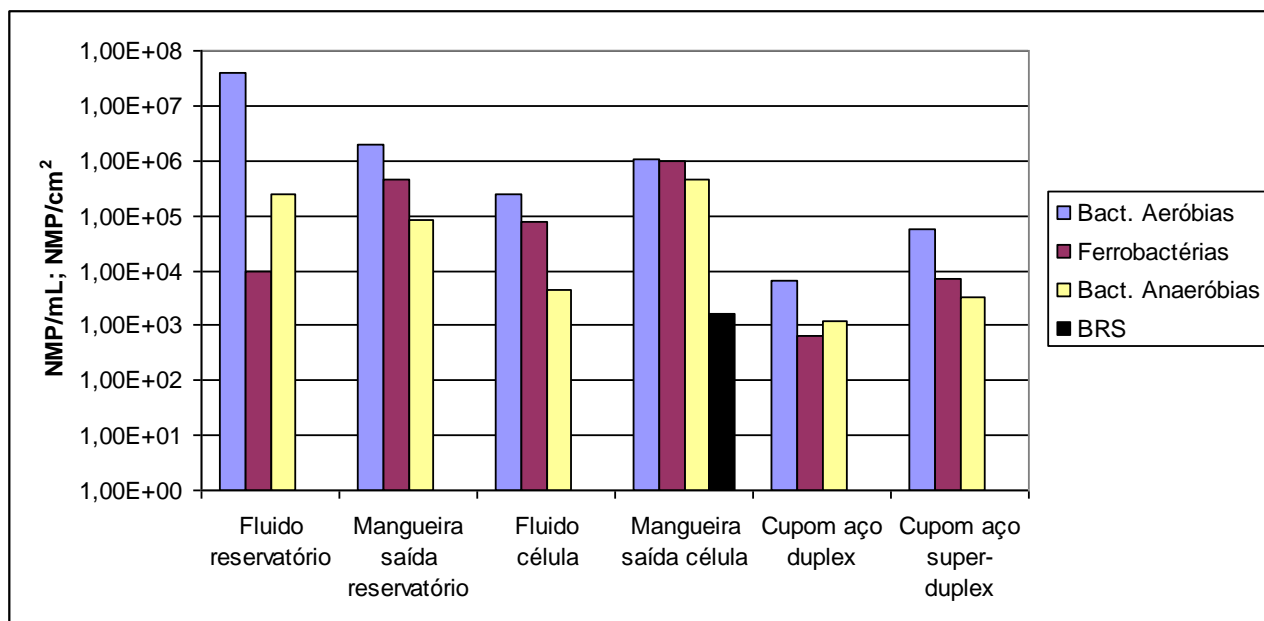


Figura 5 – Quantificação microbiológica nas amostras coletadas.

Podemos observar também uma alta concentração de ferrobactérias em todos os pontos amostrados, bem como de bactérias anaeróbias. Dentre as amostras de bactérias sésseis analisadas, o cupom de aço duplex apresentou menor concentração de bactérias para todos os grupos estudados (comparar com o cupom de aço superduplex). Destacamos a presença de BRS apenas na amostra da mangueira que saía da célula, evidenciando que este grupo bacteriano estava presente no sistema, sendo este local o único que possibilitou condições adequadas para o seu desenvolvimento.

Ensaio utilizando técnicas de biologia molecular foram realizados para complementação dos resultados. Ao receber as amostras, o DNA foi extraído para posterior identificação por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). A PCR se baseia na amplificação *in vitro*, com auxílio de uma enzima, de uma sequência específica de um gene do DNA. Os genes alvos pesquisados foram: gene do RNA ribossomal de procariontes, denominado 16S e o gene codificador da enzima sulfito redutase (*dsrAB*). Este último sintetiza a enzima responsável pela catalisação do último passo da respiração anaeróbica das BRS, a redução do sulfito a sulfeto. Através desta técnica confirmou-se a presença de bactérias totais e a ausência de bactérias redutoras de sulfato nas amostras de água e cupom nesta amostragem.

Algumas estirpes de bactérias foram isoladas em cultura pura, a partir do crescimento obtido nos procedimentos de quantificação microbiológica das amostras. As cepas isoladas foram observadas ao microscópio para determinação das características morfológicas, para isto, as células foram coradas pelo método de coloração de Gram. As características macroscópicas também foram observadas a partir das colônias microbianas que cresceram em meio de cultura sólido. As amostras foram preservadas em triplicata por congelamento em DMSO a -80°C. As cepas isoladas foram identificadas através de técnicas biomoleculares.

As cepas microbianas foram identificadas pela análise do gene rDNA 16S. Para esta identificação foram realizadas as seguintes etapas:

1. Extração de DNA – o DNA bacteriano foi extraído através de kits comerciais;
2. Amplificação de DNA – a replicação de sequência de nucleotídeos do gene rDNA 16S para bactérias foi realizada a partir da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando o “primer” universal Sadir (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAGA-3', forward) e S17 (5' GTTACCTTGTTACGACTT-3', reverse).
3. Sequenciamento do gene de RNA 16S e identificação filogenética das cepas – as sequências obtidas foram comparadas com as já disponíveis na base de dados GenBank utilizando o programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) para identificação da espécie.

Foram isoladas cepas bacterianas do gênero *Vibrio sp.* e do gênero *Staphylococcus sp.* Foi encontrada a espécie *Vibrio coralliilyticus*, comumente encontrado em ambientes marinhos, relatado na literatura como patógeno de corais, responsáveis pela síndrome do “embranquecimento”. Espécies do gênero *Staphylococcus*, são conhecidas também por sua capacidade de formar biofilme. Estudos relatam a formação de biofilme por este microrganismo em aço inoxidável utilizado em indústrias alimentícias.

Dentre os microrganismos isolados, foi identificado o fungo do gênero *Tritirachium sp.*, seu habitat natural é o solo e materiais vegetais em decomposição. Destaca-se que estes microrganismos estão presentes no ambiente e podem colonizar diferentes superfícies expostas a locais naturais e conseqüentemente, iniciar processos de biocorrosão.

O resultado deste trabalho permitiu definir e padronizar os parâmetros críticos necessários à formação de biofilme marinho em aços inoxidáveis para avaliação da suscetibilidade à corrosão por frestas destes materiais em laboratório. Ressalta-se que a vazão da água do mar mostrou ser o parâmetro mais importante para a geração do biofilme corrosivo, logo o procedimento ideal para que isto ocorra é por meio da renovação contínua deste fluido com velocidade suficiente para a manutenção da atividade microbiana.

No entanto, não foi possível correlacionar a concentração de microrganismos no biofilme com a elevação de potencial a circuito aberto e com o ataque corrosivo, visto que apesar da quantidade de bactérias presente nos cupons de aço duplex ser inferior à concentração detectada nos cupons em superduplex, somente o aço 22Cr sofreu corrosão localizada enquanto que o 25Cr foi imune ao ataque corrosivo. Como se vê, os processos que mediam o enobrecimento do potencial são complexos e de difícil entendimento, principalmente, porque as condições específicas que levam ao aumento do potencial não são estudadas/medidas no interior do biofilme ou na interface biofilme/metal.

Assim, recomenda-se dar continuidade a este estudo no sentido de estabelecer as condições da água do mar que têm maior influência na formação/agressividade do biofilme, tais como: temperatura, estação do ano, teor de carbono orgânico total, etc. Deve-se avaliar também o limite máximo de temperatura para manutenção do biofilme marinho e determinar se a corrosão dos aços duplex é acelerada em biofilmes formados em temperaturas mais elevadas, pois na maioria das plantas que utilizam água do mar natural, a temperatura de operação pode atingir temperaturas de até 45°C.

Conclusões

Há fortes indícios de que as bactérias aeróbicas presentes na água do mar são as principais responsáveis pela formação de biofilmes corrosivos (enobrecimento do potencial a circuito aberto) em aços inoxidáveis. Assim sendo, a maior vazão de troca deste fluido melhora as condições nutricionais e de aeração, proporcionando um ambiente propício ao desenvolvimento destes grupos;

As BRS não parecem estar relacionadas à corrosão dos aços duplex em água do mar, pois não foram detectadas nas amostras do reservatório de água do mar natural, na célula de teste, nem, tampouco, aderidas aos cupons de aço inoxidável duplex e superduplex. As técnicas de biologia molecular confirmaram a presença de bactérias totais e não detectaram a presença de BRS nas amostras de água e de resíduos.

Os cupons de aço duplex (22Cr) foram menos suscetíveis à adesão de bactérias aeróbias, anaeróbias e ferrobactérias, comparativamente ao aço superduplex. Essa maior concentração celular, contudo, não pode ser relacionada à corrosão localizada destes materiais pois somente o aço duplex foi suscetível ao ataque corrosivo no teste realizado à temperatura ambiente.

Recomenda-se dar continuidade a este estudo com o objetivo de conhecer a taxonomia das amostras, o que possibilitaria definir as espécies aeróbias responsáveis pelo enobrecimento do potencial.

Referências bibliográficas

- (1) BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. **Statistical for experiments** – an introduction to design, data analysis and model building. New York: John Wiley & Sons, 1978. p. 650-653.
- (2) APHA. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, 22th, 2012.